

Rad52がSUMO修飾を受けるための必要条件とその修飾意義

著者	大内 貴司
号	42
学位授与番号	427
URL	http://hdl.handle.net/10097/46052

氏 名（本籍）
おお うち たか し
大 内 貴 司

学 位 の 種 類
博 士（薬 学）

学 位 記 番 号
薬 博 第 4 2 7 号

学位授与年月日
平 成 21 年 3 月 25 日

学位授与の要件
学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科、専 攻
東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 生命薬学専攻

学 位 論 文 題 目

Rad52 が SUMO 修飾を受けるための必要条件とその修飾意義

論 文 審 査 委 員
(主 査) 教 授 榎 本 武 美
教 授 中 畑 則 道
准教授 久 下 周 佐

論文内容要旨

【背景】

多くのタンパク質は翻訳後に修飾を受けることが知られている。翻訳後修飾はタンパク質の構造や安定性に影響を与えるだけでなく、その機能までも大きく変化させる。翻訳後修飾はリン酸化、ユビキチン化、SUMO 化、アセチル化、脂質化、糖鎖修飾などが知られている。その中で SUMO 修飾とは、ユビキチンに似た三次構造を有する SUMO (small ubiquitin related modifier) が、E1 (活性化酵素)、E2 (結合酵素)、E3 (リガーゼ) の 3 つの酵素の働きにより、標的タンパク質のリジン残基にイソペプチド結合することである。一方、SUMO 修飾の解除は、脱 SUMO 酵素であるイソペプチダーゼにより被修飾タンパク質から SUMO が外されることでなされる。

これまで数百にもものぼる SUMO 化標的タンパク質が報告されているが、DNA 傷害時に起こる SUMO 修飾の詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、出芽酵母を用いて DNA 傷害時に起こる SUMO 修飾の標的タンパク質の同定とその制御機構の解明を目指した。

【結果・考察】

(1) SUMO 修飾の標的候補タンパク質の同定

これまでに、E2 結合酵素 Ubc9 の機能を減弱させた酵母細胞 (*ubc9 ts* 株) が様々な DNA 傷害剤 (DNA アルキル化剤であるメチルメタンスルフォネート (methyl methanesulfonate; MMS), DNA 複製阻害剤であるヒドロキシ尿素 (hydroxyurea; HU), DNA 複製に共役して二本鎖切断を誘導するカンプトテシン (camptothecin; CPT)) に対して感受性を示すことが所属研究室により報告されていた。さらに *ubc9 ts* 株では DNA 傷害時の相同組換えの誘導が欠損している。しかし、これらの感受性や組換えの欠損がどのような SUMO 化標的タンパク質の制御の欠損に由来するかはわかっていなかった。そこで、MMS で細胞を処理した際に SUMO 修飾を受けるタンパク質の有無を調べた結果、数十種ものタンパク質の SUMO 修飾を検出した。

標的タンパク質を特定するために、yeast two-hybrid 法を用いてチェックポイント機構と DNA 修復機構に機能するタンパク質をスクリーニングした。その結果、SUMO 修飾の標的候補タンパク質として Rad51, Rad52, Rad59, Mre11, Mus81 の 5 種類を同定することに成功した。この中で、Rad52 を細胞内で過剰発現させたところ、実際に Rad52 は細胞内で SUMO 修飾を受けた。Rad52 は DNA 組換え修復の中心酵素であるため、以後 Rad52 の SUMO 修飾に焦点をあて解析することにした。

(2) Rad52 が SUMO 修飾を受けるための必要条件

SUMO 修飾に影響を与える Rad52 のリジン残基をスクリーニングしたところ、SUMO 修飾を受けない Rad52 変異体 (*rad52-K126R*, *rad52-K200R*) を同定した。一方、Rad52 が SUMO を受ける部位として 10, 11, 220 番目の 3 箇所のリジン残基が本研究とは独立に報告された。この 3 箇所のリジン残基を、それぞれアルギニン残基へと置換した *rad52-3KR* 変異株は、ほとんど組換え反応 (DNA 二本鎖切断修復

や姉妹染色分体間の組換え)に欠損を示さないのに対し、本研究で見出した変異では組換えがほぼ完全に消失していた。そこで、両者の相違の原因の究明を行った。その結果、Rad52-K126R は Rad52 の自己会合能に部分的に欠損を示すが、Rad52-3KR は示さなかった。このことから、Rad52 が SUMO 修飾を受ける必要条件として、Rad52 が多量体形成していることが考えられた。この仮説を検証するために、SUMO 修飾の標的アミノ酸になりえないアミノ酸残基に変異を入れ、自己会合能に欠損を示す Rad52-R103A を得た。予想通り、この変異タンパク質では、Rad52-K126R と同程度まで SUMO 修飾の減弱が観察された。一方、*rad52-K200R* では自己会合能は正常にもかかわらず、SUMO 修飾が減弱した。最近、Rad52 の核移行シグナル (NLS) が 200~202 a.a. 領域に存在することが明らかにされ、Rad52-K200R が核に移行できない可能性が示唆された。そこで、Rad52-K200R の C 末に SV40 の NLS を融合し、酵母細胞に発現させると、Rad52-K200R は SUMO 修飾を受けた。以上の結果から、Rad52 が SUMO 修飾を受ける必要条件として、Rad52 が多量体形成していること及び Rad52 が核内に局在していることが考えられた。

(3) Rad52 の SUMO 修飾の生物学的意義

前述のように SUMO 修飾のアクセプターになる 3 つのリジン残基が同定されたが、この研究では、Rad52 の SUMO 修飾の生理的意義については明らかにできなかった。そこで、*rad52-3KR* 変異株を用いて DNA 傷害時に起こる DNA 組換え頻度を測定した。その結果、*rad52-3KR* は DNA 傷害時に誘導される相同染色体間の DNA 組換えに部分的な欠損を示した。この結果から、DNA 傷害依存的に起こる Rad52 の SUMO 修飾の意義は、より効率的に相同染色体間の DNA 組換えを促進させることであることが示唆された。しかし、*ubc9 ts* (E2 欠損) 株に比べて *rad52-3KR* 株の表現型 (組換え誘導欠損) は弱いことから、Ubc9 は Rad52 以外にも複数の標的タンパク質を同時に SUMO 化することで効率のよい相同組換えの誘導に関わっている可能性があり、実際に DNA 組換え関連因子である Sgs1 や Smc6 は SUMO 修飾の標的になることが報告されている。

(4) Rad51 のリクルートによる Rad52 の SUMO 修飾の消失

一連の DNA 組換え反応のどの素過程において Rad52 の SUMO 修飾が起こるのか、様々な素過程に欠損を生じさせて調べた。DNA 組換えは、DNA の傷の部位に Rad52 が結合した後に、Rad52 依存的に Rad51 が DNA に結合して Rad51/DNA フィラメントを形成することで反応が起こる。まず、DNA に Rad52 は結合するが、Rad51 が DNA に結合できない状況を作った。その結果、Rad52 の SUMO 修飾が異常に亢進した。一方、DNA に Rad51/DNA フィラメントは形成されるが、組換え反応が起らない状況を作ると、その修飾の亢進は解消された。これらの結果から、Rad52 の SUMO 修飾は Rad51/DNA フィラメントの効率的な形成に寄与すること、Rad51 が DNA 上にリクルートされると同時に Rad52 の脱 SUMO 化が起り始めることが示唆された。

(5) チェックポイント機構欠損は Rad52 の SUMO 修飾を亢進する

チェックポイント機構は DNA 傷害時に細胞周期を遅らせ DNA 修復のための時間稼ぎをし、様々な DNA 修復系の制御を行うシステムである。Rad52 の SUMO 修飾がチェックポイント機構によって制御

を受ける可能性を考え、MMS や HU 処理時のチェックポイント機構欠損株（特に *rad53* 株）の Rad52 の SUMO 修飾を調べた。予想に反し、*rad53* 株では Rad52 の SUMO 修飾が異常に亢進していた。この SUMO 修飾の亢進は S 期に特異的に観察された。MMS, HU で細胞を処理するとゲノムの一部に一本鎖 DNA 領域が露出することが報告されている。*rad53* 株の HU 処理時の Rad52 のゲノムワイドなクロマチン上への結合を調べたところ、異所的な Rad52 の染色体結合分布が観察され、その領域は一本鎖 DNA が形成されやすい領域とほぼ合致した。この Rad52 の異所的な染色体分布は、Rad52 の SUMO 修飾で E3 として機能する Siz2 を欠損させた *rad53 siz2* 株においても *rad53* 株と同様に観察された。以上より、チェックポイント機構欠損による Rad52 の異所的な染色体結合は SUMO 修飾の結果ではなく、Rad52 はチェックポイント機構欠損の結果、異所的に DNA にリクルートされ、そこで Ubc9 および Siz2 により SUMO 修飾を受けることが考えられた。

酵母ではチェックポイント機構が破綻すると染色体の転座などの異常が亢進することが知られている。これはチェックポイント変異株で、SUMO 修飾を受けた活性化状態の Rad52 が異所的な組換えの亢進を引き起こしたものであるという可能性が考えられる。ヒト細胞においても Rad52 の SUMO 修飾は検出されている。転座などの異所的な組換えによる染色体異常がヒトの癌の原因になる場合が多く、本研究により、癌化の過程の解析に、Rad52 の SUMO 修飾という新たな視点の重要性を指摘することができたと考えられる。

審査結果の要旨

タンパク質の機能は様々な翻訳後修飾により制御される。その翻訳後修飾の一つであるタンパク質の SUMO (small ubiquitin related modifier) 化では, SUMO が, E1 (活性化酵素), E2 (結合酵素), E3 (リガーゼ) の 3 つの酵素の働きにより標的タンパク質のリジン残基にイソペプチド結合する。我々の研究室では以前に, 出芽酵母の E2 変異株が「DNA 傷害時の相同組換えの誘導」に欠損を示すことを見出していた。本研究は, 相同組換えに関与する SUMO 標的候補タンパク質を探索し, 相同組換えで中心的役割を果たす Rad52 が SUMO 修飾を受けることを見出し, その修飾が起こる条件およびその修飾の意義について解析したものである。

まず初めに Two-hybrid 法により, SUMO 修飾を受けるタンパク質のスクリーニングを行い, Rad51, Rad52, Rad59 を候補として得た。これらのタンパク質のうち, Rad52 が SUMO と特に強い相互作用を示し, また, *RAD52* 変異株は種々の組換えが欠損することから, Rad52 に焦点をあてて解析を行った。実際に Rad52 を細胞に過剰発現させると SUMO 修飾を受けることが判明した。次にその修飾に影響を与えるリジン残基を調べたところ, 126 番目あるいは 200 番目のリジンをアルギニンに変換すると, Rad52 の SUMO 修飾が著しく低下することが明らかになった。126 番目の変異 (*rad52-K126R*) では Rad52 の自己会合能に欠損を示し, 200 番目の変異 (*rad52-K200R*) では自己会合能は正常だが, 核移行に欠陥があることが分かり, Rad52 が多量体形成し, 核内に局在することが Rad52 の SUMO 修飾の必要条件であることが判明した。また, Rad52 は 組換え酵素 Rad51 をクロマチン上にリクルートする役割を担うが, *rad51* 変異株において Rad52 の SUMO 修飾が著しく亢進していたことから, Rad52 が Rad51 をリクルートすることにカップルして脱 SUMO 化が起こることが示唆された。さらに, SUMO 化を受ける 3 つのリジンをアルギニンに変換した変異株では DNA 傷害時に誘導される相同染色体間の組換えに部分的な欠損を示したことから, Rad52 の SUMO 修飾は Rad51 のリクルートを促進し組換えの効率を上げている可能性が示唆された。また, チェックポイントの変異株で, Rad52 の SUMO 修飾が非常に亢進することを見出し, この変異株では Rad51 がリクルートされない可能性を示唆した。

以上のように, 本研究は相同組換えで中心的な役割を担う Rad52 の SUMO 修飾の必要条件とその修飾の意義を明確にしたものであり, 相同組換え修復の制御機構解明に新たな視点を与えるもので, その学術的価値は大変高い。

よって, 本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。